

重力が植物の形態形成をネガティブに制御する分子機構-キュウリ芽ばえのペグ形成とオーキシン-

著者	鎌田 源司
号	740
発行年	2002
URL	http://hdl.handle.net/10097/16293

氏 名(本籍)	鎌 田 源 司
学 位 の 種 類	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	農 博 第 7 4 0 号
学位授与年月日	平 成 15 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研 究 科 専 攻	東北大学大学院農学研究科応用生命科学専攻 (博士課程)
学 位 論 文 題 目	重力が植物の形態形成をネガティブに制御する分子機構 ーキュウリ芽ばえのペグ形成とオーキシナー
論文審査委員	(主 査) 教 授 高 橋 秀 幸 (副 査) 教 授 亀 谷 壽 昭 教 授 東 谷 篤 志

論文内容要旨

はじめに

キュウリをはじめとするウリ科植物は、発芽直後に、ペグとよばれる特殊な突起組織を胚軸と根の境界部（Transition Zone; TR 領域）の下側（重力刺激側）に1個形成し、それを挺子にして胚軸が伸長することによって、芽ばえが種皮から脱皮する（図 1）。このペグ形成は重力によって制御される種特異的形態形成であると考えられているが、その決定的証拠はない。これまでの研究から、ペグ形成のための重力受容には、TR 領域の内皮細胞に含まれるアミロプラストの沈降が関与し、また、ペグ形成のための内的要因として、とくにオーキシンが重要な役割を果たしていると考えられている。さらに、ペグ形成は、皮層細胞における表層微小管の配向変化を伴い、それによって皮層細胞が成長極性を局所的に変化させて生じる突出成長の結果として生じ、その細胞特異的に誘導される微小管の配向変化がオーキシンによって制御されるものと考えられている。

このウリ科植物のペグ形成は、質的に明確な現象として観察できるため、植物の重力応答機構について、容易かつユニークな解析が可能である。すなわち、ウリ科植物のペグ形成は、植物の重力応答、細胞の成長極性制御におけるオーキシンと細胞骨格の作用に関わる仕組み、それらの多様性を解明するためのモデル実験系になり得る。近年、このような植物の成長と重力の関係を明らかにするために、微小重力環境を利用した宇宙実験が行なわれるようになり、われわれも、キュウリのペグ形成に対する重力の作用を宇宙実験で検証する機会に恵まれた。

そこで本研究では、植物の重力応答および重力応答におけるウリ科植物の種特異性の分子機構を究明することを目指として、スペースシャトルを利用した宇宙実験を実施し、キュウリ芽ばえのペグ形成における重力の役割を検証すると同時に、ペグ形成に対するオーキシン作用および重力によって制御されるオーキシン動態を分子生物学的に解析した。

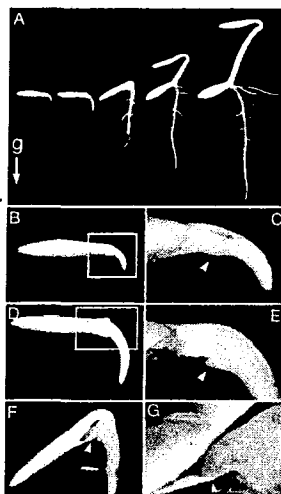


図1 キュウリ種子の発芽時におけるペグの発達とその役割

A: キュウリ種子の発芽過程, B, C: ペグ形成初期 (24 時間齢, 25℃) のキュウリ芽ばえ。種皮を取り除くと、実体顕微鏡下でペグの突起が確認できる (矢尻)。D, E: ペグ発達期 (36 時間齢, 25℃) のキュウリ芽ばえ。種皮を取り除くと、ペグ形成が確認できる (矢尻)。F, G: ペグ完成期 (48 時間齢, 25℃) のキュウリ芽ばえ。ペグが種皮の下側を押さえている (矢尻)。矢印 (g): 重力方向。

第1章 微小重力下におけるペグ形成：重力による形態形成のネガティブコントロール

軌道上で、キュウリの乾燥種子を吸水させ、その芽ばえを異なる期間育成し、3つの発育段階（ペグ形成前、ペグ形成初期、ペグ完成期）のキュウリ芽ばえを化学固定・冷蔵し、地上に回収することができた（図2）。その結果、種子の発芽率・芽ばえの成長速度に対する微小重力の顕著な影響はみとめられず、地上対照区と比較して、根および胚軸の伸長に有意な差はみとめられなかった（図2）。

しかし、微小重力下で生育したキュウリ芽ばえは、TR領域の両側に1個ずつのペグを対称的に形成し、地上で種子を縦置きにして育成した芽ばえと類似する形態を示した。一方、地上で種子を横置きにして発芽させた芽ばえでは、TR領域の下側（重力刺激側）に1個のペグを形成した（図3）。したがって、ペグ形成自身には重力を必要とせず、キュウリ芽ばえは、本来、TR領域の両面にペグを発達させるポテンシャルを有するものの、地上では、重力に応答することによって、横になったTR領域の上側（反重力刺激側）におけるペグ形成を抑制するものと考えられた。すなわち、地上で非対称に1個のペグが形成されるのは、それが、重力によってネガティブに制御されるためであることが明らかになった。

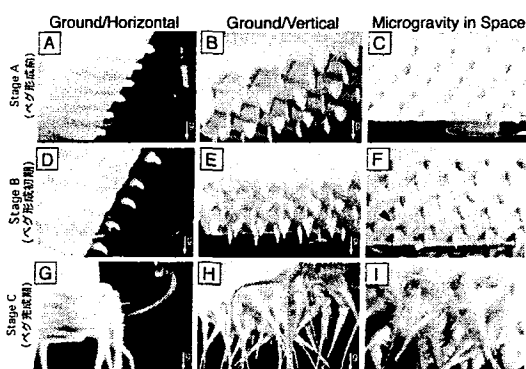


図2 微小重力下および地上で生育したキュウリ芽ばえ
A-C: ペグ形成前（ステージ A）の芽ばえ, D-F: ペグ形成初期（ステージ B）の芽ばえ, G-I: ペグ完成期（ステージ C）の芽ばえ。

A, D, G: 地上対照区の横置きの芽ばえ, B, E, H: 地上対照区の縦置きの芽ばえ, C, F, I: 微小重力区の芽ばえ。
矢印 (g): 重力方向。

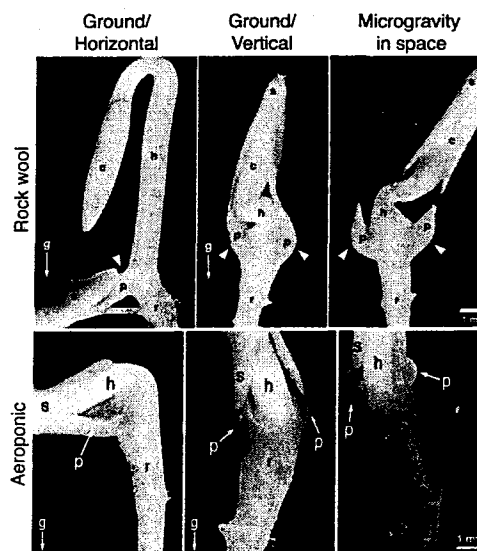


図3 微小重力下および地上で生育したキュウリ芽ばえにおけるペグ形成

上段：ロックウール中で生育した芽ばえ, 下段：ペルイータを支持体として気中に生育した芽ばえ。

写真左：地上で種子を横置きにして発芽させた芽ばえ, 写真中：地上で種子を縦置きにして発芽させた芽ばえ, 写真右：微小重力区の芽ばえ。

c: 子葉, h: 胚軸, p: ペグ, r: 根, s: 種皮,
矢印 (g): 重力方向。

第2章 重力による形態形成のネガティブコントロールとオーキシン：重力による内生オーキシン分布の制御

1. キュウリ芽ばえにおけるオーキシン誘導性遺伝子 *CS-LAA1* の発現

キュウリ植物体におけるオーキシン動態を解析するために単離されたマーカー遺伝子（オーキシン誘導性遺伝子 *CS-LAA1*）を用い、*in situ* ハイブリダイゼーション法によってオーキシン分布を解析した結果、地上で横置きにした芽ばえでは、*CS-LAA1* 遺伝子の発現は、ペグが発達する TR 領域の下側（重力刺激側）で、顕著にみとめられた（図 4）。ペグを 2 個形成した微小重力下の芽ばえでは、TR 領域全体に *CS-LAA1* 遺伝子の顕著な発現がみとめられ、地上でペグを 2 個形成した縦置き芽ばえにおける発現と類似する結果となった（図 4）。したがって、微小重力下でもペグ形成部位に十分量のオーキシンが存在するものの、その不均等分布には重力刺激を必要とすることが、宇宙実験によって初めて実証された。

ノーザン法を用いて、ペグ形成部位の TR 領域における *CS-LAA1* 遺伝子の発現を地上で縦置きにした芽ばえに比較すると、地上で横置きにした芽ばえでは TR 領域の上側（反重力刺激側）で 0.67 倍に減少し、逆に下側（重力刺激側）で 6.92 倍に増大することがわかった（図 5）。さらに、横置きの芽ばえの TR 領域の上下における *CS-LAA1* 遺伝子の発現量の差異は、10 倍にも及んだ。

これらの結果から、横置きで生育させた芽ばえが、重力を受容することによって上側（反重力刺激側）におけるペグ形成を抑制するのは、オーキシン濃度が偏差的に上側（反重力刺激側）でペグ形成のための閾値以下に低下するためであると考えられた。これを検証するために、外生オーキシン（インドール酢酸：IAA）の存在下で芽ばえを生育させたところ、横置きの芽ばえでは、TR 領域の下側（重力刺激側）だけでなく、上側（反重力刺激側）にもペグ形成がみとめられた（図 6）。これは、芽ばえの上側（反重力刺激側）におけるペグ形成の抑制が、オーキシン濃度の局所的な低下に起因するという仮説を支持するものである。

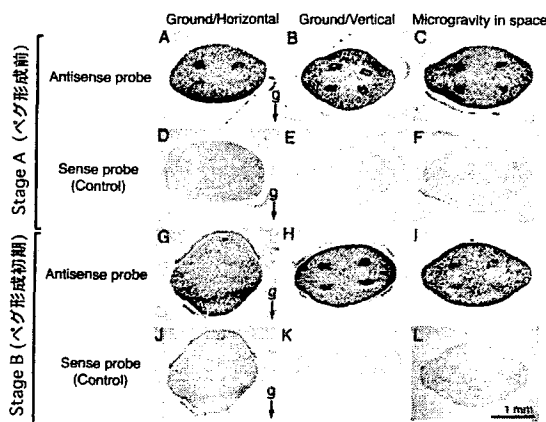


図4 微小重力下および地上で生育させたステージA（ペグ形成前）およびステージB（ペグ形成初期）のキュウリ芽ばえのTR領域における*CS-LAA1*遺伝子の発現
A, D, G, J：地上対照区の横置きの芽ばえ，B, E, H, K：地上対照区の縦置きの芽ばえ，C, F, I, L：微小重力区の芽ばえ。A-C, G-I：アンチセンスプローブ，D-F, J-L：センスプローブ。矢印（g）：重力方向。

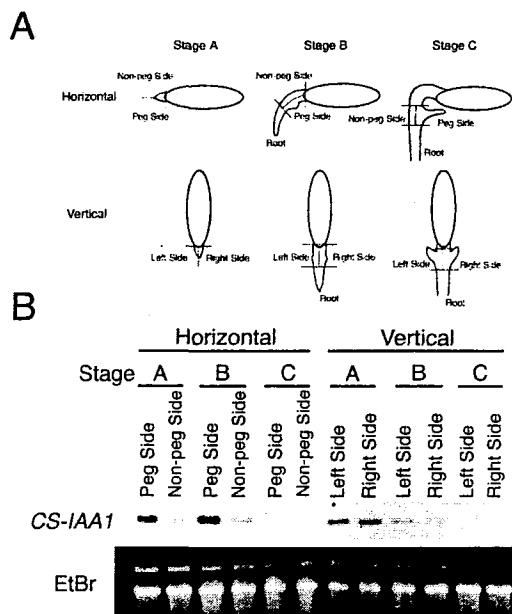


図 5 地上で生育させたステージ A (ペグ形成前), ステージ B (ペグ形成初期), およびステージ C (ペグ完成期) のキュウリ芽ばえの TR 領域における *CS-IAA1* 遺伝子の発現
A: 横置きおよび縦置きにして生育させたキュウリ芽ばえの各ステージ毎における TR 領域の分割模式図。B: ノーザン法による *CS-IAA1* 遺伝子の発現解析。

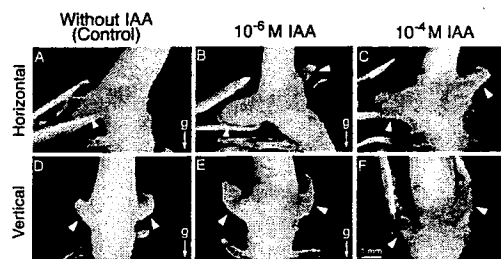


図 6 キュウリ芽ばえのペグ形成に対する外生オーキシンの影響
A, D: IAA 無処理区, B, E: 10^{-6} M IAA 処理区, C, F: 10^{-4} M IAA 処理区。A-C: 横置きで生育させた芽ばえ, D-F: 縦置きで生育させた芽ばえ。
矢尻: ペグ, 矢印 (g): 重力方向。

2. キュウリ芽ばえの内生オーキシシン量

ペグ形成初期段階の芽ばえの TR 領域における遊離型および結合型 IAA 量を定量した結果, ペグの形成される部位に比較して, ペグ形成の抑制される部位で, 遊離型 IAA 量が有意に減少し, 逆に, 結合型 IAA 量の増大していることが明らかになった (表 1)。したがって, 遊離型 IAA と結合型 IAA 間のオーキシシン代謝によってもペグ形成のためのオーキシシン濃度・分布が制御されている可能性が示唆された。

以上の結果から, 重力による形態形成のネガティブコントロールに関して, 図 7 に示すモデルを構築した。すなわち, TR 領域におけるオーキシシンは, 子葉・茎頂からの極性輸送および TR 領域における代謝・生合成によって供給されるが, 重力を受容することによって, TR 領域の上側 (反重力刺激側) では, 遊離型 IAA 量がペグ形成のための閾値以下に減少し, ペグ形成が抑制される (図 7)。一方, TR 領域の下側 (重力刺激側) では, オーキシシン濃度が閾値以上に維持・蓄積され, ペグ形成が誘導される (図 7)。

表 1 キュウリ芽ばえにおける内生オーキシシン量

Plant tissue	Content (ng gFW ⁻¹)	
	Free IAA	IAA conjugate
Horizontal / Lower	94.3 ± 15.6 ^a	2.7 ± 0.5 ^a
Horizontal / Upper	69.0 ± 11.1 ^b	6.2 ± 2.4 ^a
Vertical / Left	89.2 ± 4.7 ^a	2.7 ± 0.3 ^a
Vertical / Right	91.2 ± 3.6 ^a	2.4 ± 0.2 ^a

右肩の文字は, *p* 値 0.05 以下 (*n*=7) で有意差がみとめられることを示す。

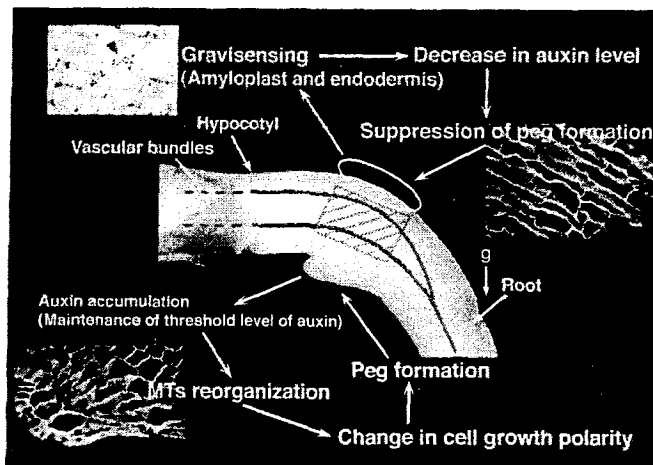


図 7 重力による形態形成のネガティブコントロールに関するモデル

キュウリ芽ばえは、内皮細胞に含まれるアミロプラストが沈降することによって重力を受容し、オーキシンの偏差的分布を誘導する。その結果、オーキシン濃度が、ペグ形成のために必要な閾値以下に減少する上側で、ペグ形成が抑制される。一方、オーキシン濃度が、ペグ形成のために必要な閾値以上に維持される下側では、皮層細胞の微小管 (MTs) の配向変化を伴って、成長極性を変化させ、ペグが形成される。矢印 (g) : 重力方向。

第3章 重力による形態形成のネガティブコントロールとオーキシン：オーキシンキャリアによるオーキシン動態の制御

1. ペグ形成に対するオーキシン輸送阻害剤の影響

キュウリ芽ばえのペグ形成に対するオーキシン輸送の役割を、オーキシン輸送（細胞外排出）阻害剤を用いて検証した。その結果、オーキシン輸送阻害剤の存在下で生育した芽ばえは、横になった TR 領域の上下に 1 個ずつ（合計 2 個）のペグを発達させた（図 8）。したがって、オーキシン輸送が重力による形態形成のネガティブコントロール（非対称なペグ形成）に必要であることが示された。

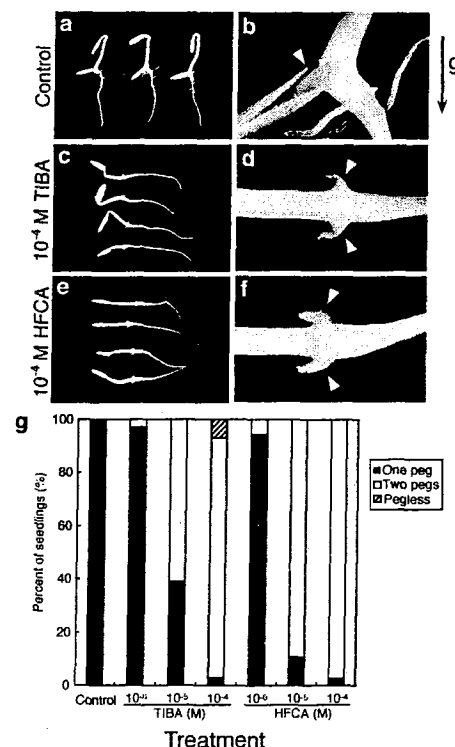


図 8 キュウリ芽ばえの重力形態形成に対するオーキシン輸送阻害剤の影響

a, b: 対照区, c, d: 10^{-4} M TIBA 処理区, e, f: 10^{-4} M HFCA 処理区, g: ペグ形成の割合。
矢尻: ペグ, 矢印 (g): 重力方向。

2. オーキシン誘導性遺伝子 *CS-LAA1* の発現に対するオーキシン輸送阻害剤の影響

オーキシン輸送阻害剤の存在下で生育した芽ばえにおけるオーキシン動態を *CS-LAA1* 遺伝子を用いて解析した。その結果、オーキシン輸送阻害剤の存在下で生育した芽ばえでは、ペグ形成部位に局所的にオーキシン量の増大することが示された（図 9, 10）。また、オーキシン飢餓処理のために芽ばえから切り出した TR 領域において、一度低下した *CS-LAA1* 遺伝子の発現が再上昇したことから（図 11）,

ペグ形成のためのオーキシンは、子葉からの極性輸送に加えて、TR 領域自身による生合成あるいは代謝によって供給されることが示唆された。したがって、オーキシシン輸送阻害剤は、オーキシシン量の豊富な TR 領域においてオーキシシンの細胞外排出を阻害することによって、細胞内オーキシシン濃度を上昇させ、下側（重力刺激側）および上側（反重力刺激側）にペグ形成を誘導するものと考えられた。

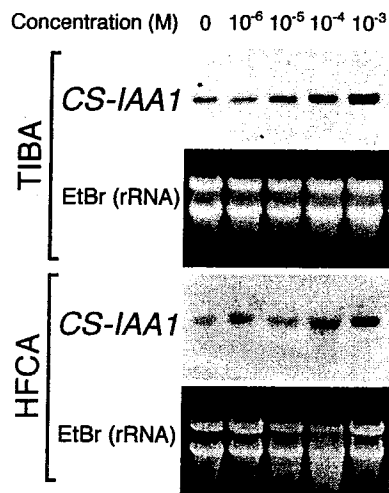


図 9 オーキシシン輸送阻害剤の存在下で生育したペグ形成初期（24 時間齢）のキュウリ芽ばえの TR 領域における *CS-IAA1* 遺伝子の発現

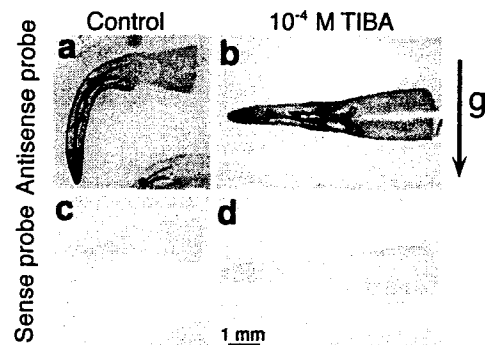
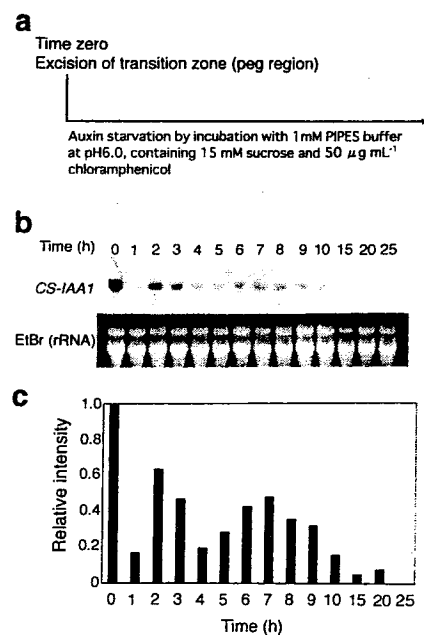


図 10 オーキシシン誘導性遺伝子 *CS-IAA1* の発現局在に対するオーキシシン輸送阻害剤（TIBA）の影響
a, c: 対照区, b, d: 10^{-4} M TIBA 処理区。
a, b: アンチセンスプローブ, c, d: センスプローブ。
矢印 (g): 重力方向。

図 11 オーキシシンの飢餓処理を連続的に行なったペグ形成初期（24 時間齢）のキュウリ芽ばえの TR 領域における *CS-IAA1* 遺伝子発現の経時的变化

a: 実験の時間経過, b: ノーザンハイブリダイゼーションによる *CS-IAA1* 遺伝子の発現, c: *CS-IAA1* 遺伝子発現の相対値。



3. オーキシンキャリア遺伝子 (*CS-AUX1* および *CS-PIN1*) の単離とその発現解析

オーキシンマーカ遺伝子の発現解析, 内生オーキシンの定量, また, オーキシン輸送阻害剤を用いた実験結果から, TR 領域における細胞内オーキシン濃度の不均等化が重力による形態形成のネガティブコントロールの本質的要因であり, その細胞内オーキシン濃度の調節に, オーキシンキャリアが重要な役割を果たすものと考えられた。そこで, キュウリからオーキシン取込みキャリア遺伝子 *CS-AUX1* およびオーキシン排出キャリア遺伝子 *CS-PIN1* を単離し, それらの発現を解析した。ノーザン法による解析の結果, ペグ形成初期の芽ばえにおいて, *CS-AUX1* 遺伝子の発現は, ペグ形成の抑制される横置き芽ばえの上側 (反重力刺激側) で弱かった (図 12)。一方, *CS-PIN1* 遺伝子は, 横になった TR 領域の上下において均等に発現した (図 12)。さらに, *in situ* ハイブリダイゼーション法を用いて局在性を解析したところ, *CS-AUX1* 遺伝子および *CS-PIN1* 遺伝子は, ともに, TR 領域の維管束組織と表皮・皮層近傍に強く発現した (図 13)。

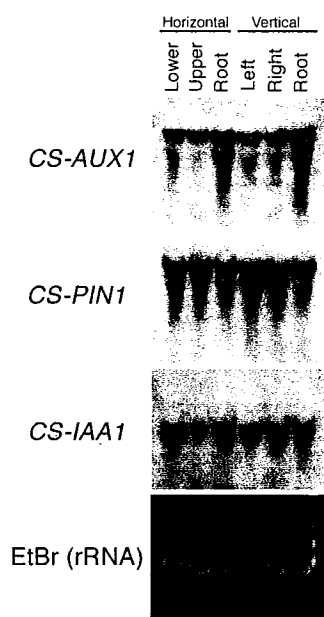


図 12 ペグ形成初期 (24 時間齢) のキュウリ芽ばえにおける *CS-AUX1*, *CS-PIN1* および *CS-IAA1* 遺伝子の発現

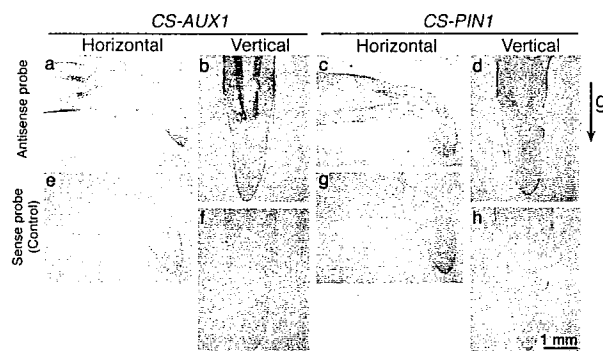


図 13 ペグ形成初期 (24 時間齢) のキュウリ芽ばえにおける *CS-AUX1*, *CS-PIN1* 遺伝子発現の局在

a, b: *CS-AUX1* 遺伝子のアンチセンスプローブ, c, d: *CS-PIN1* 遺伝子のアンチセンスプローブ, e, f: *CS-AUX1* 遺伝子のセンスプローブ, g, h: *CS-PIN1* 遺伝子のセンスプローブ

a, c, e, g: 横置きの芽ばえ, b, d, f, h: 縦置きの芽ばえ。

矢印 (g): 重力方向。

4. オーキシンキャリアタンパク質 (*CS-AUX1* および *CS-PIN1*) の発現解析

オーキシンキャリアの発現をタンパク質レベルで明らかにするために, *CS-AUX1* および *CS-PIN1* タンパク質に対する抗体を作成した。その結果, ペグ形成初期の芽ばえの TR 領域においては, *CS-AUX1* タンパク質は, 維管束組織以外の細胞に全体的に局在し, ペグ形成の抑制される部位に比較して, ペグの発達する部位で顕著に発現した (図 14)。一方, *CS-PIN1* タンパク質は, 維管束組織および表皮・皮層細胞に局在し, ペグの形成される部位に比較して, ペグ形成の抑制される部位で多く発現した (図 14)。また, *CS-PIN1* は, ペグの発達する部

位では、細胞膜全体に局在したが、ペグ形成の抑制される部位では、胚軸側と下側の細胞膜に局在した（図 14）。

以上の結果から、オーキシン流出入に機能する 2 つのキャリア（CS-AUX1 および CS-PIN1）の偏差的な発現および局在が、重力によって制御された結果、TR 領域における細胞内オーキシン濃度が偏差的に調節され、ペグ形成が制御されるという概念が構築された（図 15）。

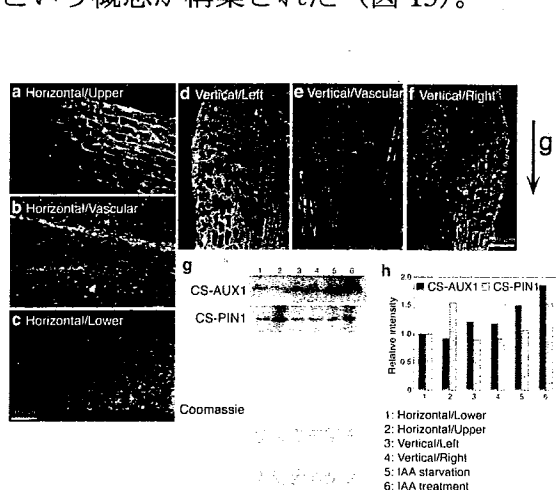


図 14 ペグ形成初期（24 時間齢）のキュウリ芽ばえの TR 領域における CS-AUX1（赤）および CS-PIN1（緑）タンパク質の発現

a-c: 横置き芽ばえ, d-f: 縦置き芽ばえ, g, h: ウエスタンブロットによる発現解析。

矢印 (g): 重力方向。

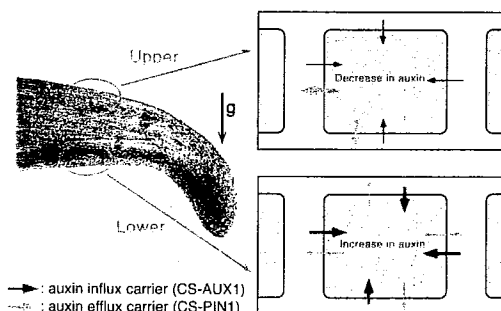


図 15 キュウリ芽ばえの TR 領域の下側（重力刺激側）と上側（反重力刺激側）におけるオーキシンキャリア（CS-AUX1, CS-PIN1）の偏差的発現による細胞内オーキシン濃度およびオーキシン分布制御に関するモデル

下側（重力刺激側）では、オーキシン取込みキャリア（CS-AUX1）の発現が排出キャリア（CS-PIN1）の発現よりも強いため、細胞内オーキシン濃度が増加する。一方、上側（反重力刺激側）では、オーキシン取込みキャリア（CS-AUX1）の発現が排出キャリア（CS-PIN1）の発現よりも弱い場合、細胞内オーキシン濃度が減少する。その結果、オーキシンは上側（反重力刺激側）で減少し、オーキシン不均等分布を誘導する。

矢印 (g): 重力方向。

まとめ

本研究により、地上におけるキュウリ芽ばえのペグ形成は、重力によってネガティブに制御される形態形成であることが明らかになった。このキュウリ芽ばえの重力形態形成を分子生物学的に解析したところ、横になった TR 領域の上側（反重力刺激側）では、ペグ形成が、オーキシン濃度の局所的な減少によって抑制されることがわかった。また、ペグ形成のためのオーキシン濃度には閾値が存在し、重力屈性の場合とは、オーキシンの作用様式が異なることが見出された。さらに、横になった TR 領域の上側（反重力刺激側）におけるオーキシンの局所的な減少には、オーキシンの代謝・生合成、そしてオーキシンの取込みおよび排出キャリアの偏差的発現が重要な役割を果たすものと考えられた。

このように本研究では、ウリ科植物のペグ形成を実験系とし、重力形態形成および重力がオーキシン動態を制御する仕組みが、遺伝子およびタンパク質レベルで明らかになり、それら分子の重力による調節機構を解明するための糸口が見出された。

論文審査結果要旨

キュウリの芽ばえは、発芽直後にペグといわれる突起状組織を、はじめ水平方向に伸長する根と胚軸の境界域の下側（重力刺激側）に形成し、それで種皮を押さえながら胚軸を伸長させることによって、種皮から抜け出す。本研究は、植物の重力応答機構を明らかにすることを目的に、キュウリ芽ばえのペグ形成を実験系とし、重力が形態形成に果たす役割を宇宙実験で検証し、その重力形態形成機構をオーキシン動態との関連から分子生物学的に解析したものである。

本研究では、まず宇宙実験で、微小重力下で生育したキュウリ芽ばえは、根と胚軸の境界域の両側に1個ずつのペグを対称的に形成し、重力はペグ形成に不可欠な要因ではないが、地上で重力刺激側に1個のペグを形成するのは、芽ばえが重力に反応して、横になった根と胚軸の境界域の上側（反重力刺激側）における1個のペグ形成を抑制するためであることを明らかにした。

次に、オーキシン誘導性遺伝子 *CS-IAA1* の発現をマーカーとして、重力応答で本質的な役割を果たすと考えられるオーキシン動態を解析した。その結果、ペグ形成の開始にともなって、*CS-IAA1* の発現が反重力刺激側で減少し、その重力刺激側（ペグ形成部位）と反重力刺激側（非ペグ形成側）における差は10倍にも及ぶこと、また、微小重力下で生育した芽ばえは、そのような *CS-IAA1* の偏差的な発現を示さないことが明らかになった。芽ばえの内生オーキシン量を定量した結果、ペグ形成初期の根と胚軸の境界域には、相対的に多くの遊離型オーキシンが含まれ、ペグ形成部位と非ペグ形成部位では、遊離型オーキシン量と結合型オーキシン量に負の相関がみとめられること、ペグ形成部位に比較して、非ペグ形成部位で遊離型オーキシン量が減少することが明らかになった。また、外生オーキシンの存在下におかれた芽ばえは、重力刺激側と反重力刺激側に1個ずつのペグを形成し、ペグ形成のためのオーキシン濃度には閾値が存在すること、ペグ形成が反重力刺激側で抑制されるのは、オーキシン濃度が、反重力刺激側で閾値以下に低下するためであることが示された。

さらに、オーキシン輸送阻害剤（細胞外排出阻害剤）で処理された芽ばえは、重力刺激側と反重力刺激側に1個ずつのペグを形成し、そのとき *CS-IAA1* 遺伝子が両側で顕著に上昇し、オーキシン輸送阻害剤処理によって細胞内オーキシン濃度が上昇することが見出された。これによって、キュウリ芽ばえの根と茎の境界域は、オーキシンプールを形成しており、重力応答によって反重力刺激側のペグ形成を抑制するためには、オーキシン輸送を介した反重力刺激側における細胞内オーキシンレベルの低下を必要とすることが示された。

これを証明するために、本研究では、キュウリからオーキシンの取込みキャリア遺伝子 *CS-AUX1* および排出キャリア遺伝子 *CS-PIN1* を単離し、その遺伝子およびタンパク質レベルでの発現を解析した。その結果、それらが芽ばえの根と胚軸の境界域でとくに強く発現すること、*CS-AUX1* は、反重力刺激側に比較して、重力刺激側で顕著な発現がみとめられ、一方、*CS-PIN1* は、重力刺激側に比較して、反重力刺激側で、その発現が多いことが明らかになった。これらの結果から、反重力刺激側では、*CS-AUX1* の発現が低く、逆に *CS-PIN1* の発現が高くなるために、細胞内オーキシン濃度が低下し、ペグ形成が抑制される可能性が示された。*CS-AUX1* および *CS-PIN1* は、遺伝子およびタンパク質レベルでオーキシン誘導性を示し、重力刺激側と反重力刺激側におけるオーキシンレベルの偏差分布を反映したフィードバック制御が細胞内オーキシン濃度の調節に関与する可能性も示唆された。

以上のように、本研究は、植物が効率的な物質生産を営むために重要な重力応答をオーキシン動態の分子制御機構から解明した。これは、重力応答機構のみならず、植物の成長制御において極めて重要なオーキシンの輸送・分配機構を究明する今後の研究に大きく貢献するものである。よって、審査員一同は、本研究論文に対し、博士（農学）の学位を授与するに値するものと判断した。